

VERIFICATION OF TRANSLATION

I, Dr. Norbert Siemons
(insert translator's name)

of Neuer Wall 41, D-20354 Hamburg/Federal Republic of Germany
(translator's address)

declare as follows:

1. That I am well acquainted with both the English and German languages, and
2. That the attached document is a true and correct translation made by me to the best of my knowledge and belief of:-


(a) The specification of International Bureau pamphlet numbered

WO00/75345

International Application No. PCT/EP00/05127

December 27, 2001
(Date)

Dr. Norbert Siemons


(Signature of Translator)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. Dezember 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/75345 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/62,
C07K 14/245, A61K 38/16, C07K 16/12

Georg [DE/DE]; Ludwig-Rinn-Strasse 15, D-35452
Heuchelheim (DE). FRANKE, Sylvia [DE/DE];
Elly-Heuss-Knapp-Weg 18, D-35396 Gießen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/05127

(22) Internationales Anmeldedatum:
5. Juni 2000 (05.06.2000)

(74) Anwälte: SIEMONS, Norbert usw.; Neuer Wall 41,
D-20354 Hamburg (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AU, BY, CN, HU, PL,
RU, UA, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
99110759.0 4. Juni 1999 (04.06.1999) EP

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): LOHMANN ANIMAL HEALTH GMBH & CO.
KG [DE/DE]; Heinz-Lohmann-Str. 4, D-27472 Cuxhaven
(DE).

Veröffentlicht:
— Mit internationalem Recherchenbericht.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BALJER,

(54) Title: RECOMBINANT FUSION PROTEIN, (VACCINE) COMPOSITION CONTAINING THE SAME AND METHOD
FOR THE PRODUCTION THEREOF

(54) Bezeichnung: REKOMBINANTES FUSIONSPROTEIN, DIESES ENTHALTENDE
(IMPF-)STOFFZUSAMMENSETZUNG UND VERFAHREN ZU DESSEN HERSTELLUNG

(57) Abstract: The invention relates to a recombinant fusion protein, containing a subgenetic Stx2e fragment of the Shiga toxin 2e
(Stx2e) in fusion with a terminal tag, whose size corresponds approximately to that of the fragment or to a fraction of said fragment.

(57) Zusammenfassung: Rekombinantes Fusionsprotein mit einem subgenischen Stx2e-Fragment des Shiga Toxins 2e (Stx2e) in
Fusion mit einem terminalen Tag, dessen Grösse etwa der Grösse des Fragmentes oder eines Bruchteils des Fragmentes entspricht.

WO 00/75345 A1

Rekombinantes Fusionsprotein, dieses enthaltende (Impf-)Stoffzusammensetzung und Verfahren zu dessen Herstellung

Die Erfindung bezieht sich auf ein rekombinantes Fusionsprotein, auf eine (Impf-)Stoffzusammensetzung mit dem rekombinanten Fusionsprotein und auf ein Verfahren zur Herstellung des rekombinanten Fusionsproteins.

Die Ödemkrankheit der Schweine wird durch Shiga-Toxin bildende Escherichia Coli (STEC) hervorgerufen. Hauptvirulenzfaktor dieser Erreger und ausschließlich verantwortlich für die klinischen Symptome ist das Shiga Toxin 2e (Stx2e) (MacLeod et al. 1991). Da die Erkrankung in vielen Fällen einen perakuten Verlauf zeigt und Therapieversuche meist zu spät begonnen werden bzw. nicht den gewünschten Erfolg zeigen, wäre die Entwicklung einer wirksamen Prophylaxe wünschenswert. Die Gewinnung und Aufreinigung des Stx2e ist problematisch.

Die B-Untereinheit des Stx2e kommt aus verschiedenen Gründen als Vakzinekandidat in Frage. Sie wird von Seren rekonvaleszenter Ferkel erkannt, d.h. sie besitzt antigene Determinanten. Des weiteren induziert die B-Untereinheit des Toxins nach parenteraler Applikation die Bildung toxin-neutralisierender Antikörper (Acheson et al. 1996; Boyd et al. 1991). Mit Hilfe gentechnischer Methoden ist es gelungen, ein rekombinantes Fusionsprotein herzustellen, das aus einem Fragment der Stx2eB-Untereinheit und der Glutathion-S-Transferase von Shistosoma Japonicum besteht (Franke et al. 1995). Bei der Ödemkrankheit der Absetzferkel wurde bereits sowohl die Erregerausscheidung als auch die immunologische Reaktion auf die STEC-Infektion über einen längeren Zeitraum untersucht. Das zum Nachweis von Stx2e-Antikörpern eingesetzte rekombinante

Fusionsprotein aus einem Fragment der Stx2eB-Untereinheit und der Glutathion-S-Transferase eignete sich sehr gut zum indirekten Nachweis der STEC-Infektion und wurde bislang als potentiell Impfantigen zur Prophylaxe der Ödemkrankheit angesehen (Wieler L. H., Franke Sylvia, Rose M. und Karch H. Charakterisierung der Immunantwort bei der Ödemkrankheit des Schweines mit einer rekombinanten B-Untereinheit des Shiga-like-Toxins-II_e. Vortrag gehalten auf dem 21. DVG Kongress in Bad Nauheim (März 1995)).

Davon ausgehend liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein insbesondere für Impfzwecke geeignetes rekombinantes Fusionsprotein, ein dieses codierendes Plasmid, eine das Fusionsprotein enthaltende (Impf-)Stoffzusammensetzung für verschiedene Verwendungen im Zusammenhang mit der Ödemkrankheit, insbesondere der Schweine, und ein Verfahren zur Herstellung des rekombinanten Fusionsproteins zur Verfügung zu stellen.

Die Aufgabe wird durch ein rekombinantes Fusionsprotein mit den Merkmalen des Anspruchs 1, eine (Impf-)Stoffzusammensetzung mit den Merkmalen des Anspruchs 5, einen E.coli-Stamm gemäß Plasmid gemäß Anspruch 18 und durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 20 gelöst. Ausgestaltungen der Erfindung sind in den Unteransprüchen angegeben.

Erfindungsgemäß werden ein rekombinantes Fusionsprotein und eine dieses enthaltende (Impf-)Stoffzusammensetzung zur Verfügung gestellt, die im Zusammenhang mit der Ödemkrankheit, insbesondere der Schweine, verschiedenen Verwendungen zugeführt werden können. So kommen insbesondere als Verwendungen in Betracht:

- der Nachweis von Antikörpern gegen Stx2e,
- die Diagnose der Ödemkrankheit,
- die Erzeugung monoklonaler Antikörper gegen das Toxin des Ödemkrankheitserregers, insbesondere als Basis für die Kontrolle der Ausbeute bei der Gewinnung des rekombinanten Fusionsproteins oder als Basis für die Gewinnung des Holotoxins durch immunaffinitätschromatografische Reinigung,
- die Immunisierung gegen die Ödemkrankheit, insbesondere der Schweine.

Das rekombinante Fusionsprotein ist ein subgenisches Stx2e-Fragment des Shiga-Toxins 2e in Fusion mit einem terminalen Tag, dessen Größe etwa der Größe des Fragments oder eines Bruchteils des Fragments entspricht. Der terminale Tag ist eine markierte Endgruppe in der Aminosäurefolge des Proteins. Vorzugsweise ist das subgenische Stx2e-Fragment eine B-Untereinheit (Stx2eB) des Shiga Toxins 2e. Die Größe des terminalen Tags beträgt vorzugsweise maximal 5 kDa, weiterhin vorzugsweise maximal 1 kDa. Weiterhin vorzugsweise handelt es sich dabei um einen aminoterminalen His-Tag. Das His-Tag umfaßt sechs Histidine. Seine Größe beträgt ca. 0,66 kDa.

Das rekombinante Fusionsprotein weist wesentliche antigene Domänen des nativen Proteins auf, die seine Eignung für verschiedene Verwendungen im Zusammenhang mit der Ödemkrankheit begründen. Dies ist zwar theoretisch auch schon bei den bislang bekannten rekombinanten Fusionsproteinen aus einem Fragment der Stx2eB-Untereinheit und der Gluthathion-S-Transferase der Fall. Hier stellt sich allerdings das Problem, daß nach Einschätzung der

Anmelderin mit störenden immunologischen Reaktionen gerechnet werden muß, die einem Einsatz der gattungsgemäßen Fusionsproteine zu z.B. therapeutischen Zwecken entgegenstehen. Ein wesentlicher Vorteil der erfindungsgemäßen Fusionsproteine besteht demgegenüber darin, daß hier aufgrund des speziell ausgewählten Tags nicht mit störenden Immunantworten zu rechnen ist und damit erstmals Fusionsproteine zur Verfügung stehen, die z.B. in Impfstoffen einsetzbar sind. Wie bei gattungsgemäßen Fusionsproteinen, so begünstigt auch das erfindungsgemäß verwendete Tag die Gewinnung des rekombinanten Fusionsproteins, insbesondere dessen Reinigung, beispielsweise durch ein Affinitätschromatografisches Verfahren.

Oligomere aus vernetzten His-Stx2eB-Monomeren können besonders wirksame Fusionsproteine bilden.

Gemäß einer vorteilhaften Ausgestaltung umfaßt die (Impf-)Stoffzusammensetzung außer den rekombinanten Fusionsproteinen mindestens ein zusätzliches Antigen. Bei einer Impfstoffzusammensetzung handelt es sich dann um eine Formulierung einer immunogenen Menge des rekombinanten Fusionsproteins und einer immunogenen Menge mindestens eines zusätzlichen Antigens. Mit diesem Kombinationsimpfstoff kann eine gleichzeitige Impfung gegen die Ödemkrankheit der Schweine und gegen mindestens eine weitere Krankheit erfolgen.

Insbesondere kann die (Impf-)Stoffzusammensetzung außer den rekombinanten Fusionsproteinen mindestens ein zusätzliches Antigen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem Pasteurella multocida-Bacterin mit einem zellgebundenen Toxoid, einem Bordetella

bronchiseptica-Bacterin, einem Erysipelothrix rhusiopathiae-Antigen, einem oder mehreren löslichen zellfreien Toxoiden vom Pasteurella multocida Typ D und/oder Escherichia coli und/oder Clostridium perfringens, inaktivierten ganzen Zellen von Pasteurella multocida Typ A oder D, Kulturen von Actinobacillus pleuropneumoniae, Haemophilus parasuis, Escherichia coli, Clostridium perfringens, Streptokokkus suis, Mycoplasma hyopneumoniae sowie Porcine Reproduction and Respiratory Syndrom Virus, Influenzavirus, Pseudorabiesvirus und Porcine Circovirus I und II ist.

Vorstehende Antigene sind für die Verursachung folgender Krankheiten bekannt:

- Pasteurella multocida und Bordetella bronchiseptica verursachen die progressive atrophische Rhinitis der Schweine, auch „Schnüffelkrankheit“ genannt; pathogenetisch spielen vor allem die Pasteurella multocida Toxine eine bedeutende Rolle (in kommerziellen Impfstoffen ist der Toxoidgehalt wichtig)
- Pasteurella multocida A und D kommt vor bei Atemwegserkrankungen des Schweins (Lungenentzündung), Pasteurella multocida D verursacht auch die Schnüffelkrankheit
- Erysipelothrix rhusiopathiae – Rotlaferkrankung
- Escherichia coli – Durchfallerkrankungen (Sonderform ist die Ödemkrankheit der Schweine) (Toxine sind entscheidend)

- Clostridium perfringens: nekrotisierende Enteritis der Saugferkel (Toxine sind entscheidend)
- Actinobacillus pleuropneumoniae: hämorrhagisch-nekrotisierende Pleuropneumonie
- Haemophilus parasuis: Glässersche Krankheit (Fibrinöse Serosen- und Gelenkentzündung)
- Streptokokkus suis: Streptokokken Septikämie
- Mycoplasma hyopneumoniae: Enzootische Pneumonie, auch als „Ferkelgrippe“ bezeichnet
- Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: bei Ferkeln Atemwegserkrankung (Lungenentzündung), bei Sauen Fruchtbarkeitserkrankungen
- Influenzavirus: Atemwegserkrankung
- Pseudorabiesvirus: Aujeszky'sche Krankheit des Schweines (Pseudowut)
- Porcine Circovirus I und II: Post-weaning multisystemic wasting syndrome.

Vorzugsweise ist das mindestens eine zusätzliche Antigen so ausgewählt, daß es sich auf eine Krankheit bezieht, die das Schwein typischerweise etwa in dem gleichen Alter wie die Ödemkrankheit befällt. Das ist bei den oben

angeführten Antigenen weitgehend der Fall. Die Impfstoffzusammensetzung ermöglicht dann eine besonders wirksame Kombinationsimpfung.

In der Impfstoffzusammensetzung ist vorzugsweise das rekombinante Fusionsprotein und/oder das mindestens eine zusätzliche Antigen jeweils in einer immunogenen Menge für die Impfung von Schweinen gegen die Ödemkrankheit der Schweine oder gegen die Ödemkrankheit der Schweine und andere virale und/oder bakterielle Infektionen enthalten.

Darüber hinaus bezieht sich die Erfindung auf Impfstoffzusammensetzungen, deren Zusammensetzungen und/oder Mengen so gewählt sind, daß eine Immunisierung des jeweiligen Tieres gegen die mindestens eine Krankheit durch sequentielle und/oder gleichzeitige Impfung mit den Impfstoffzusammensetzungen erreichbar ist.

Von besonderer Bedeutung für die (Impf-)Stoffzusammensetzung ist die Auswahl des Adjuvans. Beispielsweise kann eine W/O/W- (z. B. ISA 206), eine W/O-Emulsion (z. B. iFA-inkomplettes Freund'sches Adjuvans, eine wäßrige Suspension (z. B. Aluminiumhydroxid) oder eine O/W-Emulsion zum Einsatz kommen.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zur rekombinanten Herstellung eines subgenischen Fragments des Shiga Toxin 2e (Stx2e) in Fusion mit einem terminalen Tag wird in ein geeignetes Vektorsystem eine Untereinheit aus dem Stx2e-Operon kloniert, das entstandene rekombinante Plasmid in einen E. coli-Stamm transformiert, das entstandene Expressionssystem induziert und das Fusionsprotein exprimiert und gereinigt.

Das Gen der B-Untereinheit von Shiga Toxin 2e (Stx2eB) wurde in verschiedene Expressionsvektoren kloniert. Mit den so entstandenen rekombinanten Plasmiden wurden verschiedene E-coli-K12-Laborstämme transformiert. Alle Transformanten wurden in Expressionsstudien unter variierenden Bedingungen (Temperatur, Induktionslevel, Induktionsdauer) auf Bildung der rekombinanten B-Untereinheit getestet. Der Transformant bzw. Klon mit der höchsten Ausbeute an rekombinantem Protein im Verhältnis zum Gesamtzellproteingehalt wurde ermittelt. Für das von diesem Stamm gebildete Fusionsprotein, bestehend aus der reifen B-Untereinheit mit einem N-terminalen His-Tag (His-Stx2eB), wurde ein Reinigungsverfahren entwickelt und im Labormaßstab getestet. Für die Umsetzung des Reinigungsverfahrens im Großmaßstab ist FPLC unter Verwendung geeigneter Puffersysteme vorgesehen.

Beispiel

Herstellung der rekombinanten B-Untereinheit des Stx2e

Für die Herstellung der rekombinanten B-Untereinheit wird der Stamm E. coli Cux-Stx2eB, DSM-Nr. 12721 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D-38124 Braunschweig), verwendet. Dieser E. coli-Laborstamm enthält das Plasmid pHIT-24, welches die B-Untereinheit des Stx2e kloniert.

Von diesem Stamm wurde ein seed lot System angelegt und bei -78°C, abgefüllt in 2 ml Kryo-Vials, gelagert.

Für die Produktion der rekombinanten B-Untereinheit wird 1 Ampulle working seed (2 ml) für die Anzucht einer Vorkultur 1 aufgetaut.

Die Vorkultur 1 wird unter folgenden Bedingungen hergestellt :

Medium : 150 ml sterile Standard-I-Nährbouillon + 0,01% Ampicillin in einem Erlenmeyerkolben 300 ml

Bebrütung : 15 Stunden bei 37 °C, Standkultur

Für den Hauptansatz wird ein Fermenter "BIOSTAT B" mit einem 5-L-Kulturgefaß benutzt. Dieses Gefäß ist mit 4 L Standard-I-Nährbouillon + 0,01% Ampicillin gefüllt und wurde als Einheit für 25 Minuten bei 121 °C autoklaviert..

In dieses Medium wird die Vorkultur 1 gegeben und unter folgenden Bedingungen für 6 Stunden kultiviert :

Temperatur : 37 °C

pH = 7,0-7,1

Rührgeschwindigkeit : 100-150 rpm

Luftzufuhr : 2 L / min

Die Regulierung des pH wird durch das automatische Zugeben einer sterilen 10 % NaOH-Lösung gewährleistet.

Die Induktion wurde nach 6 Stunden Kultivierung durch Zugabe von 0,25 mM IPTG-Lösung * und einem pH-Sprung von 7,1 auf 7,5 eingeleitet. Die Induktionsdauer betrug ca. 3,5 Stunden.

Anschließend wurde die Kultur in ein 10-L-Erntebehälter gepumpt und in einer Zentrifuge mit 2500 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 200 ml eines 8 M Harnstoffpuffers aufgenommen und für ca. 15 Stunden in einem Kühlraum (4-8 °C) verbracht. Das resuspendierte Pellet wurde danach mit Ultraschall behandelt (4 x 15 Minuten, 190 Hertz, 0,3 Sekunden pulsierend) und anschließend mit 10 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entnommen und diente der weiteren Bearbeitung; das bei diesem Schritt erhaltene Pellet wurde verworfen.

Im Anschluß daran wurde die Lösung mittels einer Ultrafiltration ("Pellicon XL ") von 200 ml auf 80 ml eingengt.

Die so erhaltene 80 ml-Proteinlösung wurde dann mittels einer Affinitäts-Chromatographie (FPLC "Äktaexplorer") weiter bearbeitet.

Das das rekombinante Zielprotein enthaltene Material wurde fraktioniert, jeweils 3 ml, aufgetragen und über eine mit Metall-Chelat-Matrix (Ni-NTA, Qiagen) beladene Säule (Volumen : ° ml) gegeben.

* IPTG: Isopropylbeta-D-Thiogalaktopyranosid

Diese Matrix bindet spezifisch das His-Tag des rekombinanten Proteins. Das Targetprotein wird vom Metall festgehalten und unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff, 0,1 M Na_2HPO_4 , 10 mM Tris/HCL, pH 8) gewaschen. Nach der Entfernung der kontaminierenden Proteine wird das rekombinante Protein durch einen pH-Sprung (8 M Harnstoff, 0,1 M NaH_2PO_4 , 10 mM Tris/HCL, pH 3) von der Affinitätsmatrix desorbiert und am Säulenausgang aufgefangen.

Das gereinigte Protein wird mittels Cross-Flow-Filtration (Porengröße 5 kDa) konzentriert. Nach Prüfung der Reinheit und Ausbeute (über SDS-Gelelektrophorese, Westernblotting, Elisa, Proteinbestimmung) erfolgt der Austausch des Harnstoff-Puffers gegen eine physiologische Pufferlösung (PBS, pH 7,2). Der Austausch erfolgt mittels Cross-Flow-Filtration (Porengröße 5 kDa).

Das rekombinante Protein lag in einer Konzentration von 300 µg/ml vor.

Beschreibung des rekombinanten Fusionproteins

Das Targetprotein wird durch das Genfragment Stx2eB codiert. Die Größe dieses subgenischen Fragments der B-Untereinheit von Stx2e beträgt 228 bp.

Folgende eigenschaften des rekombinanten Proteins wurden geprüft :

1. Molekulargewichtsgröße

Das Targetprotein hat ein in der SDS-Gelelektrophorese ermitteltes Molekulargewicht von ca. 7,5 kDa.

2. Kontrolle des rekombinanten Proteins im Immunoblot mit Seren erkrankter Ferkel

Das gereinigte Antigen wurde im Immunoblot mit Seren von an Ödemkrankheit erkrankten Ferkeln untersucht. Bei den Tieren handelte es sich um Ferkel aus Schweinezuchtbetrieben, in denen klinisch manifeste Erkrankungen mit Stx2e-E.coli-Stämmen auftraten.

Über 90 % dieser Seren reagierten positiv mit dem rekombinanten Protein. Um falsch positive Ergebnisse auszuschließen, wurden die Untersuchungen mit der B-Untereinheit, an die Glutathion-S-Transferase von *Schistosoma japonicum* gekoppelt, verifiziert.

3. Kontrolle des rekombinanten Proteins mit monoklonalen Antikörpern gegen Stx2eB

Um festzustellen, ob die Konformation der rekombinanten B-Untereinheit dem Wildtyp-Protein ähnelt, wurde das rekombinante Stx2eB im Dot-Blot-Verfahren untersucht.

Dazu wurde der monoklonale Antikörper BC5BB12 eingesetzt, der spezifisch die B-Untereinheit von Stx2 erkennt und auch mit der B-Untereinheit von Stx2e kreuzreagiert.

Als Positivkontrolle wurde das Stx2e-Holotoxin mitgeführt. Als Negativkontrolle diente eine Rohtoxinpreparation von Stx1.

Der monoklonale Antikörper BC5BB12 reagierte sowohl mit dem Stx2e-Holotoxin, als auch mit dem rekombinanten Stx2eB-Protein, jedoch nicht mit dem Stx1.

4. Prüfung des rekombinanten Proteins auf Zytotoxizität im Verozelltest

Die Zytotoxizität des rekombinanten Proteins wurde im Zytotoxizitätstest an Verozellen, Helazellen sowie MDBK-Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden Konzentrationen von 0,3 µg/ml bis 100 µg/ml an rekombinanten Stx2eB eingesetzt. Selbst in den niedrigsten Verdünnungsstufen konnte in keiner der untersuchten Zelllinien ein signifikanter Unter-

schied zur Negativkontrolle (Puffer ohne rekombinantes Protein) festgestellt werden. Diese Ergebnisse bestätigen, daß das rekombinante Stx2eB per se nicht zytotoxisch ist.

5. Nachweis der Immunogenität des rekombinanten Stx2eB im Kaninchenversuch.
Zwei weibliche Kaninchen der Rasse "Weiße Neuseeländer" im Alter von ca. 12 Monaten wurden mit dem rekombinanten Stx2eB immunisiert. Bei der 1. Vakzination wurden 100 µg Antigen unter Zugabe von inkompletten Freundschens Adjuvans (iFA) subcutan verabreicht. Die Boosterung erfolgte sechs Wochen später mit 50 µg rekombinantem Stx2eB subcutan, ebenfalls mit iFA. Die vor und nach der Vakzinierung gewonnenen Seren wurden im Immunoblot untersucht.
In beiden Kaninchen wurde eine spezifische Serumkonversion nachgewiesen.

Beschreibung der Herstellung von Vakzineformulierungen (Beispiele)

1. Herstellung einer W/O/W-Vakzineformulierung
Unter sterilen Bedingungen wird das Antigen als wäßrige Phase (Temperatur 22°C) während des Rührens (U.T. < 2000 Upm) kontinuierlich in das Adjuvans (z. B. Montanide ISA 206) gegeben. Anschließend wird die Emulsion 10 Minuten bei ca. 2000 Upm homogenisiert.
Nach 24 h Lagerungszeit bei 8°C wird die Vakzineformulierung erneut homogenisiert. Die Phasenlage wird mikroskopisch und im Färbetest geprüft.
2. Herstellung einer W/O-Vakzineformulierung
Unter sterilen Bedingungen wird das Antigen als wäßrige Phase (Temperatur 22°C) während des Rührens (U.T. < 2000 Upm) kontinuierlich in das Adjuvans (z. B. inkomplettes Freundsches Adjuvans) gegeben und emulgiert.
Die Phasenlage wird mikroskopisch und im Färbetest geprüft.
3. Herstellung einer wäßrigen Suspension
Unter sterilen Bedingungen wird das wäßrige Antigen während des Rührens (z.B. Magnetrührer) kontinuierlich in das wäßrige Adjuvans (z. B. Aluminiumhydroxide) gegeben und gerührt.
Die Vakzine wird geprüft anhand der Parameter pH und Tonizität.
4. Herstellung einer O/W-Suspension
Unter sterilen Bedingungen wird das wäßrige Antigen kontinuierlich in das Adjuvans gegeben und emulgiert.
Die Phasenlage wird mikroskopisch und im Färbetest geprüft.

Nach der Herstellung der Vakzineformulierungen wurde diese bis zu ihrer weiteren Verwendung im Kühlschrank bei Temperaturen von +4°C - +8°C gelagert.

Beispiel des Nachweises der immunogenen Wirkung des rekombinanten Stx2eB im Zieltier Schwein unter Verwendung verschiedener Vakzineformulierungen

Ziel des Versuches

Untersuchung der Fragestellung : Kann das gentechnisch hergestellte rekombinante Stx2eB-Protein (unter Verwendung verschiedener Adjuvantien) nach zweimaliger i.m. Applikation im Absatzferkel eine Immunantwort induzieren ?

Für diesen Versuch wurden 8 Absetzer im Alter von 6 Wochen eingesetzt.

6 Tiere wurden mit Vakzinepräparationen behandelt, 2 Tiere erhielten ein Placebo verabreicht.

Die Impfstoffapplikationen erfolgten zweimal im Abstand von 3 Wochen.

Von jedem Tier wurden folgende Blutproben entnommen .

1. Vor der 1. Immunisierung
2. 14 Tage nach der 1. Immunisierung
3. Unmittelbar vor der 2. Immunisierung (21 Tage nach der 1. Immunisierung)
4. 14 Tage nach der 2. Immunisierung
5. 21 Tage nach der 2. Immunisierung

Die Seren wurden im Elisa auf das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern untersucht, die gegen das rekombinante Stx2eB gerichtet sind.

Außerdem wurden die Verträglichkeit und Sicherheit der Vakzine bewertet.

Allgemeine Versuchsdaten

Tiere

Tierart : Schwein

Tierkategorie : Absetzer

Alter : 6 Wochen (bei 1. Impfung)

Geschlecht : gemischt

Immunstatus der Tiere bei Versuchsbeginn : Stx2eB-Antikörper negativ

Haltungsform : Gruppenhaltung

Fütterungsschema : ad libitum

Wasserversorgung : aus Wasserleitung ad libitum

Einsatz von Futterzusatzstoffen : kein Einsatz von Futterzusatzstoffen

Impfstoffverabreichungsparameter

Applikationsweise : Injektion

Applikationsweg : i. m.

Zeitraum zwischen den zwei Impfstoffapplikationen : 3 Wochen

Vorbehandlung des verabreichten Mittels : keine

Vorbehandlung der Versuchstiere : keine

Anzahl der Impfungen : 8

Anzahl der Kontrolltiere : 2

Studiendesign : randomisiert, blind

Impfstoffdosis, Tierkennzeichnung, Vakzineinsatz

Der konkrete Versuchsplan ist in Tabelle 1 dargestellt.

Adjuvansschlüssel

Adjuvans A - ISA 206

Adjuvans B - iFA

Adjuvans C - Montanide

Versuchsverlauf

Auftreten von Nebenwirkungen : nach 1. Impfung - leichte Beeinflussung des Allgemeinzustandes und der Futteraufnahme,
Tier 7 und 8 hatten eine leichte Körpertemperaturerhöhung + leichten Durchfall
nach 2. Impfung - außer Körpertemperaturerhöhung beim Tier 8 keine weiteren Nebenwirkungen

Anzahl der Tiere, die während des Versuches ausschieden :

Asetzer Nr. 2, Grund : E.coli-verursachte Magen - und Darmentzündung

Auftreten von Krankheiten, die nicht mit der Vakzination zusammenhängen :
außer der Erkrankung beim Absetzer Nr. 2 keine

Behandlung mit anderen Mitteln : keine

Ergebnisse

Verträglichkeit und Sicherheit der Vakzineformulierungen :

Die Vakzineformulierungen können insgesamt als verträglich und sicher eingeschätzt werden, obwohl es nach der 1. Immunisierung zu einer leichten Störung des Allgemeinbefindens, zu einer kurzzeitigen Beeinträchtigung der Futteraufnahme und zu einer Körpertemperaturerhöhung - verbunden mit leichten Durchfall - bei den Tieren 7 und 8 kam. Die 2. Impfung wurde ohne das Auftreten von klinischen Symptomen vertragen. Nur das Tier Nr. 8 reagierte auf die erneute Imstoffapplikation mit einer Erhöhung der Körpertemperatur.

Lokale Gewebsreaktionen - palpatorisch bemerkbares leichtes Ödem - traten nur nach der 1. Impfung an der Injektionsstelle der Tiere 5 und 6 auf.

Nach der Schlachtung der Ferkel konnten an den Injektionsstellen, mit Ausnahme der Tiere 1 und 3, makroskopisch erkennbare Entzündungen um den Strichkanal, die mit nekrotischem Material bei allen Tieren ausgefüllt war, festgestellt werden. Bei der histologischen Untersuchung der Ferkel 1 und 3 konnte nur eine leichte Bindegewebsproliferation (Angioblasten mit Infiltration von Lymphozyten und Histiozyten) festgestellt werden, während der mit nekrotischem Material ausgefüllte Stichkanal bei allen anderen Ferkeln mit einer bindegewebigen Kapsel umgeben war. In der bindegewebigen Kapsel konnte eine Entzündung mit Infiltration von Lymphozyten und Histiozyten beobachtet werden.

Wirksamkeit der Vakzineformulierungen

Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, daß das rekombinante Stx2eB nach i. m. Applikation in 6 Wochen alten Absetzern vom Immunsystem der Tiere erkannt wird und eine Immunantwort - Produktion von spezifischen Immunglobulinen - induziert.

Der Nachweis dieser Antikörper wurde mittels Elisa und Immunoblot durchgeführt.

Die Stärke der Immunantwort scheint von der Wahl der verwendeten Vakzineformulierung abhängig zu sein.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnten die besten Ergebnisse mit einer W/O-Emulsion (z. B. unter Verwendung von iFA) erzielt werden. Im einzelnen sind die Ergebnisse in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 1: Versuchsmuster, Gewicht der Tiere und die verabreichte Menge der Impfstoffe

Nr. der Tiere	Bezeichnung	Zusammensetzung	Gehalt wirksamer Bestandteile	Anzahl der Schweine/VM	Körpergewicht in kg	Verabreichte Impfstoffmenge in ml
1	Stx2eB Vaccine G27V27	PBS Adjuvans A	-	2	12,5	2,2
3	01 Placebo	Thiomersal			12,5	2,2
2	Stx2eB Vaccine	rStx2eB Adjuvans A	0,167 mg/ml	2	15	2,7
4	G97V27-02	Thiomersal			13	2,3
5	Stx2eB Vaccine	rStx2eB Adjuvans B	0,167 mg/ml	2	16	2,9
6	G97V27-03	Thiomersal			12,5	2,2
7	Stx2eB Vaccine	rStx2eB Adjuvans C	0,250 mg/ml	2	14	2,5
8	G97V27-04	Thiomersal			14	2,5

Hinterlegter Mikroorganismus:

Der E.Coli-Stamm Cux-Stx2eB wurde hinterlegt unter der ursprünglichen
Bezeichnung: Cux-SLT-IIe-B bei der

DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
GmbH,

Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig.

Ihm wurde von der Hinterlegungsstelle die Eingangsnummer

DSM 12721

zugeteilt.

Ansprüche

1. Rekombinantes Fusionsprotein mit einem subgenischen Stx2e-Fragment des Shiga Toxins 2e (Stx2e) in Fusion mit einem terminalen Tag, dessen Größe etwa der Größe des Fragmentes oder eines Bruchteils des Fragmentes entspricht.
2. Rekombinantes Fusionsprotein nach Anspruch 1, bei der das subgenische Stx2e-Fragment eine B-Untereinheit (Stx2eB) des Shiga Toxins 2e ist.
3. Rekombinantes Fusionsprotein nach Anspruch 1 oder 2 mit einer Größe des terminalen Tags von maximal 1 kDa.
4. Rekombinantes Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3 mit einem aminoterminalen His-Tag.
5. Rekombinantes Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 4 mit mehreren vernetzten Fusionsproteinen.
6. (Impf-)Stoffzusammensetzung für verschiedene Verwendungen im Zusammenhang mit der Ödemkrankheit der Tiere, insbesondere Säugetiere, vor allem Schweine, mit einem subgenischen Fragment des Shiga Toxins 2e (Stx2e) in Fusion mit einem terminalen Tag, dessen Größe etwa der Größe des Fragmentes oder eines Bruchteils des Fragmentes entspricht.

7. (Impf-)Stoffzusammensetzung nach Anspruch 6, bei der das subgenische Stx2e-Fragment eine B-Untereinheit (STx2eB) des Shiga Toxins 2e ist.
8. (Impf-)Stoffzusammensetzung nach Anspruch 6 oder 7 mit einer Größe des terminalen Tags von maximal 1kDa.
9. (Impf-)Stoffzusammensetzung nach einem der Ansprüche 6 bis 8 mit einem aminoterminalen His-Tag.
10. (Impf-)Stoffzusammensetzung nach einem der Ansprüche 6 bis 9 mit mehreren vernetzten Fusionsproteinen.
11. (Impf-)Stoffzusammensetzung nach einem der Ansprüche 6 bis 10, die ein zusätzliches Antigen oder mehrere zusätzliche Antigene umfaßt.
12. (Impf-)Stoffzusammensetzung nach Anspruch 11, wobei das eine oder mehrere zusätzliche Antigen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Pasteurella multocida-Bacterin mit einem zellgebundenen Toxoid, einem Bordetella bronchiseptica-Bacterin, einem Erysipelothrix rhusiopathiae-Antigen, einem oder mehreren löslich zellfreien Toxoiden von Pasteurella multocida Typ D und/oder Escherichia coli und/oder Clostridium perfringens, inaktivierten ganzen Zellen von Pasteurella multocida Typ A oder D, Kulturen von Actinobacillus pleuropneumoniae, Haemophilus parasuis, Escherichia coli, Clostridium perfringens, Streptokokkus suis, Mycoplasma hyopneumoniae sowie Procine Reproduction and Respiratory Syndrom Virus, Influenzavirus, Pseudorabiesvirus und Porcine Circovirus I und II.

13. Impfstoffzusammensetzung nach einem der Ansprüche 6 bis 12, die das subgenische Stx-IIe-Fragment des Shigatoxins 2e (Stx2e) in Fusion mit einem terminalen Tag und/oder das mindestens eine zusätzliche Antigen jeweils in einer immunogenen Menge für die Impfung von Schweinen gegen die Ödemkrankheit der Schweine oder gegen die Ödemkrankheit der Schweine und andere virale und/oder bakterielle Infektionen umfaßt.
14. Impfstoffzusammensetzungen nach einem der Ansprüche 6 bis 13 in Zusammensetzungen und Mengen, so daß sie bei sequentieller und/oder gleichzeitiger Impfung von Schweinen diese gegen die Ödemkrankheit der Schweine oder gegen die Ödemkrankheit der Schweine und andere virale und/oder bakterielle Infektionen immunisieren.
15. (Impf-)Stoffzusammensetzung mit einem subgenischen Stx2e-Fragment des Shiga Toxins 2e (Stx2e) in Fusion mit einem terminalen Tag, insbesondere nach einem der Ansprüche 6 bis 12, in einer W/O/W-Emulsion, in einer O/W-Emulsion, in einer W/O-Emulsion oder in einer wäßrigen Suspension.
16. (Impf-)Stoffzusammensetzung nach Anspruch 15 mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans (iFA).
17. Plasmid enthaltend DNA, die ein Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 6 codiert.
18. E.Coli-Stamm, transformiert mit einem Plasmid gemäß Anspruch 17.

19. E.coli-Stamm gemäß Anspruch 18, hinterlegt bei der DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH unter der Nummer DSM 12721.
20. Verfahren zur rekombinanten Herstellung eines subgenischen Fragmentes des Shiga Toxins 2e (Stx2e) in Fusion mit einem terminalen Tag, bei dem in ein geeignetes Vektorsystem eine Untereinheit aus dem Stx2e-Operon kloniert wird, das entstandene rekombinante Plasmid in einen E.coli-Stamm transformiert wird, das entstandene Expressionssystem induziert wird und das Fusionsprotein exprimiert und gereinigt wird.
21. Verfahren nach Anspruch 20, bei dem das subgenische Fragment eine B-Untereinheit (Stx2eB) des Shiga Toxins 2e ist.
22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, bei dem das terminale Tag eine Größe von maximal 1kDa hat.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 22, bei dem das terminale Tag ein aminoterminales His-Tag ist.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 23, bei dem die Expressionskultur einer Lysepufferbehandlung unterzogen wird.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 24, bei dem die Expressionskultur einer Behandlung in einer French Press oder mittels Ultraschall unterzogen wird.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 25, bei dem die Expressionskultur nach Behandlung mit der French Press oder mittels Ultraschall und/oder mit Lysepuffer einer affinitätschromatografischen Reinigung zugeführt wird.
27. Verfahren nach Anspruch 26, bei dem die Reinigung mittels einer FPLC durchgeführt wird.
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 27, bei dem das gereinigte Fusionsprotein vernetzt wird.
29. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 28, bei dem durch Fusion von Milzzellen von unter Verwendung des rekombinanten Fusionsproteins immunisierten Mäusen mit Myelomzellen Hybridoma-Klone für die Herstellung von Anti-Stx2eB-Immunglobulinen erzeugt werden.
30. Verfahren nach Anspruch 29, bei dem die mittels der Hybridoma-Klone produzierten Antikörper zur in-process-Kontrolle für die Produktion der rekombinanten Fusionsproteine verwendet werden.
31. Verfahren nach Anspruch 29 oder 30, bei dem die von den Hybridoma-Klonen produzierten Antikörper für ein immunaffinitätschromatografisches Reinigungsverfahren für das Stx2e-Holotoxin verwendet werden.

PCT/EP 00/05127

IPC 7 C12N15/62 C07K14/245 A61K38/16 C07K16/12

IPC 7 C07K C12N A61K

EPO-Internal

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
------------	--	-----------------------

X	WO 98 11229 A (HENRY M JACKSON FOUNDATION FOR) 19 March 1998 (1998-03-19) the whole document	1-31
X	WO 96 30043 A (OPHIDIAN PHARMACEUTICALS) 3 October 1996 (1996-10-03) page 13, line 13 - line 31; figure 10 page 25, line 4 - line 17; examples 6A, 6B page 18, line 4 - line 6	1-27

-/-

Y Patent family members are listed in annex.

*& document member of the same patent family

15/09/2000

Smalt. R

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VON WIELER, L.H. ET AL.: "Untersuchungen zur Immunantwort bei der Ödemkrankheit von Absatzferkeln mit einer rekombinanten B-Untereinheit des Shiga-like-Toxins-IIe." DEUTSCHE TIERARTZLICHE WOCHENZEITSCHRIFT, vol. 102, January 1995 (1995-01), pages 40-43, XP002120988 abstract page 42, middle column, line 7 - line 13	1-31
Y	WO 97 31117 A (UNIVERSITEIT MAASTRICHT ;BRUGGEMAN CATHARINA ANNA (BE); VINK CORNE) 28 August 1997 (1997-08-28) page 7, line 9 - line 15; claim 2	1-31
A	WO 96 12802 A (KINK JOHN A ;FIRCA JOSEPH R (US); PADHYE NISHA V (US); THALLEY BRU) 2 May 1996 (1996-05-02) the whole document	
A	FR 2 766 193 A (INST CURIE) 22 January 1999 (1999-01-22)	
A	DE 42 19 696 A (BIOTECHNOLOG FORSCHUNG GMBH) 19 August 1993 (1993-08-19)	
A	ACHESON D W K ET AL: "EXPRESSION AND PURIFICATION OF SHIGA-LIKE TOXIN II B SUBUNITS" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 63, no. 1, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 301-308, XP000198707 ISSN: 0019-9567	
A	FRANKE, S. ET AL.: "Construction of recombinant Shiga-like toxin-IIv (SLT-IIv) and its use in monitoring the SLT-IIv antibody status of pigs." VETERINARY MICROBIOLOGY, vol. 43, 1995, pages 41-52, XP002120989 cited in the application abstract page 42, paragraph 3 page 46, paragraph 3.3 page 49, paragraph 5 page 50, paragraph 2 - paragraph 3	

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In Application No

PCT/EP 00/05127

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>GUNZER, F. ET AL.: "Expression of A and B subunits of Shiga-like toxin II as fusions with glutathione S-transferase and their potential for use in seroepidemiology." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 31, no. 10, October 1993 (1993-10), pages 2604-10, XP002120990 abstract page 2609, line 11 - line 12</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In International Application No

PCT/EP 00/05127

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9811229 A	19-03-1998	AU 4184597 A EP 0929679 A	02-04-1998 21-07-1999
WO 9630043 A	03-10-1996	AU 5431196 A CA 2218601 A EP 0817647 A JP 11506424 T US 6080400 A	16-10-1996 03-10-1996 14-01-1998 08-06-1999 27-06-2000
WO 9731117 A	28-08-1997	US 5800981 A AU 1876397 A CA 2246802 A EP 0882132 A	01-09-1998 10-09-1997 28-08-1997 09-12-1998
WO 9612802 A	02-05-1996	US 5736139 A US 5919665 A US 5601823 A US 5196193 A AU 709586 B AU 3968395 A AU 4876399 A BR 9509903 A CA 2203504 A CN 1176658 A CZ 9701250 A EP 0796326 A FI 971732 A HU 78048 A NO 971868 A NZ 295998 A PL 320214 A ZA 9508990 A AU 688763 B AU 6653894 A CA 2150935 A EP 0671902 A WO 9413264 A US 5762934 A US 5814477 A US 5466672 A US 5599539 A US 5719267 A AT 170079 T AU 638786 B AU 6895191 A DE 69032599 D EP 0498854 A WO 9106306 A US 5443976 A US 5904922 A US 5340923 A	07-04-1998 06-07-1999 11-02-1997 23-03-1993 02-09-1999 15-05-1996 25-11-1999 25-11-1997 02-05-1996 18-03-1998 18-03-1998 24-09-1997 23-06-1997 28-07-1999 24-06-1997 28-10-1999 15-09-1997 15-05-1996 19-03-1998 04-07-1994 23-06-1994 20-09-1995 23-06-1994 09-06-1998 29-09-1998 14-11-1995 04-02-1997 17-02-1998 15-09-1998 08-07-1993 31-05-1991 01-10-1998 19-08-1992 16-05-1991 22-08-1995 18-05-1999 23-08-1994
FR 2766193 A	22-01-1999	AU 8812498 A EP 1017715 A WO 9903881 A	10-02-1999 12-07-2000 28-01-1999
DE 4219696 A	19-08-1993	AT 152483 T AU 3628293 A	15-05-1997 03-09-1993

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Application No

PCT/EP 00/05127

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 4219696 A		DE 59306342 D	05-06-1997
		DK 627006 T	03-11-1997
		WO 9316186 A	19-08-1993
		EP 0627006 A	07-12-1994
		ES 2104130 T	01-10-1997
		JP 7505052 T	08-06-1995

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 C12N15/62 C07K14/245 A61K38/16 C07K16/12

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 C07K C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 11229 A (HENRY M JACKSON FOUNDATION FOR) 19. März 1998 (1998-03-19) das ganze Dokument	1-31
X	WO 96 30043 A (OPHIDIAN PHARMACEUTICALS) 3. Oktober 1996 (1996-10-03) Seite 13, Zeile 13 - Zeile 31; Abbildung 10 Seite 25, Zeile 4 - Zeile 17; Beispiele 6A, 6B Seite 18, Zeile 4 - Zeile 6 — -/-	1-27



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. September 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

15/09/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Smalt, R

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	VON WIELER, L.H. ET AL.: "Untersuchungen zur Immunantwort bei der Ödemkrankheit von Absetzferkeln mit einer rekombinanten B-Untereinheit des Shiga-like-Toxins-IIe." DEUTSCHE TIERARTZLICHE WOCHENZEITSCHRIFT, Bd. 102, Januar 1995 (1995-01), Seiten 40-43, XP002120988 Zusammenfassung Seite 42, mittlere Spalte, Zeile 7 - Zeile 13	1-31
Y	WO 97 31117 A (UNIVERSITEIT MAASTRICHT ;BRUGGEMAN CATHARINA ANNA (BE); VINK CORNE) 28. August 1997 (1997-08-28) Seite 7, Zeile 9 - Zeile 15; Anspruch 2	1-31
A	WO 96 12802 A (KINK JOHN A ;FIRCA JOSEPH R (US); PADHYE NISHA V (US); THALLEY BRU) 2. Mai 1996 (1996-05-02) das ganze Dokument	
A	FR 2 766 193 A (INST CURIE) 22. Januar 1999 (1999-01-22)	
A	DE 42 19 696 A (BIOTECHNOLOG FORSCHUNG GMBH) 19. August 1993 (1993-08-19)	
A	ACHESON D W K ET AL: "EXPRESSION AND PURIFICATION OF SHIGA-LIKE TOXIN II B SUBUNITS" INFECTION AND IMMUNITY, Bd. 63, Nr. 1, 1. Januar 1995 (1995-01-01), Seiten 301-308, XP000198707 ISSN: 0019-9567	
A	FRANKE, S. ET AL.: "Construction of recombinant Shiga-like toxin-IIv (SLT-IIv) and its use in monitoring the SLT-IIv antibody status of pigs." VETERINARY MICROBIOLOGY, Bd. 43, 1995, Seiten 41-52, XP002120989 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 42, Absatz 3 Seite 46, Absatz 3.3 Seite 49, Absatz 5 Seite 50, Absatz 2 - Absatz 3	

-/-

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>GUNZER, F. ET AL.: "Expression of A and B subunits of Shiga-like toxin II as fusions with glutathione S-transferase and their potential for use in seroepidemiology." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Bd. 31, Nr. 10, Oktober 1993 (1993-10), Seiten 2604-10, XP002120990 Zusammenfassung Seite 2609, Zeile 11 - Zeile 12</p>	

INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/05127

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9811229 A	19-03-1998	AU 4184597 A EP 0929679 A	02-04-1998 21-07-1999
WO 9630043 A	03-10-1996	AU 5431196 A CA 2218601 A EP 0817647 A JP 11506424 T US 6080400 A	16-10-1996 03-10-1996 14-01-1998 08-06-1999 27-06-2000
WO 9731117 A	28-08-1997	US 5800981 A AU 1876397 A CA 2246802 A EP 0882132 A	01-09-1998 10-09-1997 28-08-1997 09-12-1998
WO 9612802 A	02-05-1996	US 5736139 A US 5919665 A US 5601823 A US 5196193 A AU 709586 B AU 3968395 A AU 4876399 A BR 9509903 A CA 2203504 A CN 1176658 A CZ 9701250 A EP 0796326 A FI 971732 A HU 78048 A NO 971868 A NZ 295998 A PL 320214 A ZA 9508990 A AU 688763 B AU 6653894 A CA 2150935 A EP 0671902 A WO 9413264 A US 5762934 A US 5814477 A US 5466672 A US 5599539 A US 5719267 A AT 170079 T AU 638786 B AU 6895191 A DE 69032599 D EP 0498854 A WO 9106306 A US 5443976 A US 5904922 A US 5340923 A	07-04-1998 06-07-1999 11-02-1997 23-03-1993 02-09-1999 15-05-1996 25-11-1999 25-11-1997 02-05-1996 18-03-1998 18-03-1998 24-09-1997 23-06-1997 28-07-1999 24-06-1997 28-10-1999 15-09-1997 15-05-1996 19-03-1998 04-07-1994 23-06-1994 20-09-1995 23-06-1994 09-06-1998 29-09-1998 14-11-1995 04-02-1997 17-02-1998 15-09-1998 08-07-1993 31-05-1991 01-10-1998 19-08-1992 16-05-1991 22-08-1995 18-05-1999 23-08-1994
FR 2766193 A	22-01-1999	AU 8812498 A EP 1017715 A WO 9903881 A	10-02-1999 12-07-2000 28-01-1999
DE 4219696 A	19-08-1993	AT 152483 T AU 3628293 A	15-05-1997 03-09-1993

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 4219696 A		DE 59306342 D	05-06-1997
		DK 627006 T	03-11-1997
		WO 9316186 A	19-08-1993
		EP 0627006 A	07-12-1994
		ES 2104130 T	01-10-1997
		JP 7505052 T	08-06-1995

